

## 각종 스트레스성 자극에 의한 허혈 / 재관류 심장 보호 효과\*

서울대학교 의과대학 약리학교실  
인제대학교 의과대학 가정의학교실\*\*  
박종완 · 서홍관\*\* · 김명석

### = Abstract =

#### The Protective Effects of Various Stress Modalities on Ischemic/Reperfused Hearts of Rats

Jong-Wan Park, M.D., Hong-Gwan Seo, M.D.,\*\* Myung-Suk Kim, M.D.  
*Department of Pharmacology, College of Medicine, Seoul National University, Seoul, Korea*  
*Department of Family Medicine, College of Medicine, Inje University, Seoul, Korea\*\**

**Background :** It has been found that stress challenge with heat shock produces the acquisition of cellular resistance to ischemic injury in the hearts, which is associated with stress protein induction. The conventional heat shock(42℃ of rectal temperature for 15min, anesthetized animal), however, is strong enough to endanger the animal life and then not suitable for practical application in human. The present study was performed in an attempt to search the safely applicable stress modalities to acquire the myocardial tolerance to ischemia-reperfusion injury.

**Methods :** Male, Sprague-Dawley rats(200-250g) were exposed to various stressful conditions, such as heat stimulation(environmental temperature of 42℃ for 30min, live animal), swimming(20min), immobilization(60min), treadmill exercise(20M/min, 30min) and hyperbaric oxygenation(3atm, 60min) given once a day for 5days. Twenty-four hours after the last application the hearts were isolated and perfused with oxygenated Krebs-Henseleit buffer solution by Langendorff method. Ischemia-reperfusion injury was produced by 20 min-global ischemia followed by 30 min-reperfusion. Cardiac mechanical function, lactate dehydrogenase release, the induction of stress proteins were assayed and compared between the stressed and the control animals.

**Results :** Upon reperfusion after ischemia the recovery of cardiac function was significantly improved in the stressed animals. The percentile recovery at 30min of reperfusion was in a range from 55.3%(swimming) to 89.3%(treadmill exercise), which was significantly higher than that of the control hearts(38%). The functional recovery of the conventional heat shocked heart

---

\*본 연구는 1994년도 교육부 학술연구조성비(기초의학)와 1994년도 서울대학교병원 지정진료연구비의 보조로 이루어졌음.

was 57.7%. In stressed animals, lactate dehydrogenase release, which indicates myocardial cell injury, was significantly reduced by 20 to 30% compared to that for the control. The expression of an inducible form of 70 series stress protein, SP72, which was assayed by immunoblotting method, was markedly increased by heat stimulation while the other stress modalities failed to increase it. There were no appreciable inductions of SP73(constitutive form) and GRP78 in the stressed animals.

**Conclusion** : These results suggest that the cardiac protection from the ischemia-reperfusion injury could be induced by the repetitive non-fatal stress stimulations and that SP70 family proteins may be partly involved in the cardioprotective effect produced by heat stimulation, but not play the essential roles in anti-ischemic effects produced by other stress modalities.

**KEY WORDS** : Ischemia-reperfusion injury · Stress · Stress protein.

## 서 론

심장의 비가역적 허혈손상 및 재관류손상을 방지하기 위한 방법으로 SOD, catalase, vit E 등 항산화물질들을 포함한 약물요법이 실험적으로 시도되었다<sup>1)</sup>. 그러나 이러한 약물요법은 허혈/재관류 손상을 근본적으로 막아주지 못하고 단지 손상과정을 지연시킬 뿐이며, 외부에서 투여한 약물들은 혈류공급이 차단된 허혈부위로 침투하는 것이 원활하지 않으므로 임상적으로 효과를 기대하기 어렵다는 부정적인 시각도 있다. 따라서 최근에는 약물을 사용하기보다 세포가 가진 자기방어능력을 향진 시킴으로서 심장의 허혈/재관류손상을 방지하자는 연구들이 새롭게 시도되고 있다<sup>2)</sup>.

모든 생명체는 급격한 온도 변화, 영양 결핍, 저산소증, 감염, 유독성 화학물질, 방사능 등의 스트레스 상황에 대하여 적응하여 스스로를 방어하고자 한다. 이러한 적응과정의 자세한 기전에 관하여 규명된 바가 거의 없으며, 단지 결과적으로 세포는 가해진 스트레스에 대하여 내성을 획득함이 알려져 있을 뿐이다. 더욱이 흥미로운 사실은 이렇게 내성을 얻게 된 세포는 차후에 가해지는 같은 종류의 스트레스뿐만 아니라 다른 종류의 스트레스에 대해서도 잘 견딘다는 것이다. 이러한 교차내성의 일례로 고온자극에 폭로되었던 개체의 심장이 고온에 대한 내성뿐 아니라 허혈/재관류 손상에 대한 내성 또한 획득할 수 있음이 Currie등<sup>3)</sup>에 의해 보고되었다. 이들은 실험적으로 체온(직장온도)을 42℃로 15분간 유지시켰던 흰쥐의 심장에서 대조군 심장에 비하여 허혈후 심기능회복이 우수하고 세포질 효소의 유출이 감소함을

보고하였다. 이후에도 세포배양<sup>4)</sup>, 적출장기<sup>5)</sup>, in vivo<sup>6)</sup> 등의 여러 실험모델을 통하여 고온자극에 의해 허혈손상이 방지됨이 보고되었다.

심장에서 고온자극에 의한 허혈내성 획득의 기전에 관하여 현재로서는 자세히 알려진 바가 없지만 이에 관한 몇 가지 가설 가운데 하나로 스트레스 단백질(stress protein, SP)이 모종의 역할을 하리라는 주장이 있다. 대표적인 SP로는 SP90, SP70, SP60, SP25 계열 등이 있고 이외에도 minor SP들이 있다<sup>7)</sup>. 이 중 특히 SP70 계열은 포유동물에서 가장 많이 발현되는 SP로 열자극에 의해 각종 장기에서 생성이 증가된다. 이러한 SP70 계열의 생성이 고온자극뿐 아니라 허혈자극에 의해서도 유도됨이 최근에 보고되면서 이 단백질이 열내성과 허혈내성에 공통적으로 작용할 수 있으리라 추정되고 있다<sup>8)</sup>. 그러나 SP70이 열내성 획득에 중요한 역할을 할 것임은 인정되고 있지만, 허혈내성의 경우에는 어느 정도 역할을 할 지에 대해서 명백하지가 않다. 아직도 SP70과 허혈내성과의 원인-결과 관계가 뚜렷이 증명되지 못한 실정이며, SP70 발현이 증가하여도 in vivo 허혈손상이 방지되지 않는다고<sup>9)</sup>, SP70의 발현시기와 허혈내성 획득 시기가 일치하지 않는다는 반론도 있다<sup>10)</sup>.

그런데 지금까지 허혈내성을 획득하기 위해 가해진 고온자극 방법은 상당히 심한 고열조건으로서, 그 고온자극 자체가 또한 심각한 문제를 일으킨다. 대부분 실험의 고온자극 조건은 직장온도를 42℃로 15분간 유지하는 것인데, 이러한 조건은 토끼의 경우에 20% 치사율을 나타낼 정도로 매우 위험하다<sup>10)</sup>. 따라서 고온자극을 이용하여 허혈내성을 유도하는 방법은 실제적으로 실현하기 곤란하기 때문에 보다 안전한 스트레스 적용 방법이 요

구되고 있다. 따라서 본 연구에서는 안전하게 심장의 허혈내성을 유도할 수 있는 스트레스성 자극을 찾고, 각 스트레스 조건에서 SP의 발현양상을 조사하여 이를 허혈내성 정도와 비교함으로써 SP가 허혈내성 획득에 참여할 가능성을 조사하고자 하였다.

## 연구 재료 및 방법

### 1. 연구 재료

실험동물은 체중 200g 내외의 웅성 Sprague-Dawley계 흰쥐 94마리를 사용하였으며, 환경 및 감염에 의한 스트레스를 배제하기 위하여 동물실을 22℃ 항온과 SPF 조건으로 유지시켰다. 스트레스 단백질의 Immunoblotting에 사용한 anti-hsp73, anti-hsp72, anti-grp78 항체는 Stressgen사(Kennebunk)에서 구입하였으며, anti- $\alpha$ -sarcomeric actin 항체는 Sigma사 제품을 사용하였다. Secondary antibody(peroxidase conjugated anti-mouse IgG antibody, alkaline phosphatase conjugated anti-rabbit IgG antibody)와 발색시약은 Bio-Rad사 제품을 사용하였다. 기타 모든 시약들은 특급시약을 사용하였다.

### 2. 연구 방법

#### 1) 실험군의 설정

(1) 대조군(CON) : 스트레스를 가하지 않은 정상 흰쥐  
(2) HEAT-SHOCK(HS) : 통상의 고온자극 조건을 적용한 비교대조군이다. 흰쥐를 pentobarbital로 마취시킨 상태에서 heat pad로 몸을 감싸 직장온도를 42℃, 15분간 유지시켰다. 이 군은 다른 스트레스를 시행한 실험군의 결과를 평가하기 위한 비교 기준이 된다.

#### (3) 실험군 : 각종 스트레스를 가한 흰쥐

다음과 같은 스트레스를 1일에 1회씩, 5일간 시행하고 24시간이 지난 후 심장을 적출하여 실험에 사용하였다.

(a) MILD HEAT STRESS(H) : 경미한 열자극을 가하는 실험군이다. 흰쥐를 마취하지 않은 상태로 42℃의 온도와 적절한 습도가 유지되는 chamber에 30분간 넣었다. 이러한 조건에서는 직장온도가 41℃에서 42℃ 사이로 10분간 유지되며 고열에 의한 후유증이 없음을 예비실험을 통해 확인하였다.

(b) HYPERBARIC OXYGEN STRESS(O) : 산화성 자극의 한 유형으로 선택하였다. 흰쥐를 3기압의

100% 산소가 유지되는 고압산소기에 넣어 1시간 동안 산화성 스트레스를 가하였다.

(c) IMMOBILIZATION(I) : 정신적 스트레스의 한 유형으로 선택되었다. 흰쥐의 등이 나무판에 닿도록 하고 사지를 비닐테이프로 나무판에 1시간 동안 고정시켰다.

(d) TREADMILL EXERCISE(T) : 신체적 스트레스의 한 유형으로 선택하였다. Treadmill을 이용하여 흰쥐를 20m/min의 속도(경사도는 10° 임)로 매일 30분씩 달리게 하였다.

(e) SWIMMING(S) : 정신적 스트레스와 신체적 스트레스가 혼합된 스트레스로 수영을 택하였다. 2m×1.5m×50cm(세로×가로×높이)의 욕조에 25℃의 물을 채우고 흰쥐를 넣어 20분간 수영시켰다.

#### 2) 심장 허혈 / 재관류손상 유도

각 실험군의 흰쥐에 sodium pentobarbital(30mg/kg)을 복강주사하여 마취시킨 후 인공호흡 상태에서 흉부를 절개하였다. 대동맥을 절개하고 카놀라를 삽입한 다음 폐장을 포함한 주위조직을 제거하고 끝이 Langendorff 관류장치에 대동맥 삽입관을 연결시켜 역방향 관류를 실시하였다. 관류액은 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>로 포화시킨 Krebs-Henseleit(K-H) 완충용액(NaCl 118mM, NaHCO<sub>3</sub> 27.2mM, KCl 4.8mM, MgSO<sub>4</sub> 1.2mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1mM, CaCl<sub>2</sub> 1.25mM, Glucose 10mM, pH 7.4)을 80cm H<sub>2</sub>O의 일정 압력으로 관류하고, 심장 온도를 37℃로 일정하게 유지하였다. 충분히 산소가 포화된 K-H용액으로 15분 동안 관류하여 심기능이 안정화되면 대동맥 삽입관에 장치된 3-way 코크를 막아 심장허혈을 유도하였다. 20분 허혈을 지속한 다음 다시 3-way 코크를 열어 재관류 시켰다. 모든 심장은 실험이 끝나면 종축으로 4등분하여 표면에 묻은 물기를 닦아 내고 무게를 측정하였다.

#### 3) 심기능 지표

심기능의 지표로서 심박수와 좌심실 압력을 측정하였다. 좌심실 압력은 생리식염수로 채워진 balloon이 부착된 20G의 plastic 삽입관을 승모판을 통해서 좌심실에 삽입하고 압력변환기에 연결한 후, 생리기록계를 이용해서 측정하였다. 이때 안정화된 심장의 좌심실 이완기말 압력(left ventricular end-diastolic pressure, LVEDP)이 5mmHg가 되도록 balloon을 팽창시켰다. 심박수는 1분간 기록된 수축 횟수로 계산하였고 좌심실

이완기말 압력은 심근의 경축(contracture) 정도를 그리고 수축기말 압력과 이완기말 압력의 차이(좌심실압)를 심근의 수축력을 나타내는 지표로 사용하였다. 또한 좌심실압에 심박수를 곱하여 심기능지수를 산출하였다. 허혈조작전의 심기능 지수를 기준으로 허혈후 재관류 5분, 10분, 30분에서 심기능 지수의 백분율을 계산하여 심기능 회복을 관찰하였다.

#### 4) 심근세포 손상의 지표

세포질 효소인 lactate dehydrogenase(LDH)의 유출을 심근세포 손상의 지표로 삼았다. 20분간의 허혈후 재관류 초기 5분까지 관류액을 받아 관류량을 측정하고 이를 얼음 속에 보관하여 8시간 내에 효소측정 시료로 사용하였다. LDH 활성은 48mM phosphate buffer (pH 7.5), 0.6mM sodium pyruvate, 0.18mM NADH를 함유한 반응계에 관류액 시료 0.5ml를 첨가한 후 25℃에서 NADH가 NAD로 산화되는 과정을 340 nm에서의 흡광도 변화로 기록 측정하였다<sup>11)</sup>

#### 5) 스트레스 단백질의 Immunoblot

심실조직을 SDS 시료용액(2% sodium dodecylsulfate, 5% mercaptoethanol, 0.125M Tris/HCl pH 6.8)에 넣고 polytron으로 균질화 하였다. 균질액은 5분간 100℃ 중탕하고 상온에서 100,000g, 1시간 원심하여 상청액을 취하여 단백질을 BCA방법으로 측정하였다. 이 시료중 단백질을 10ug을 8% discontinuous SDS polyacrylamide gel에 loading하고 bromophenol blue가 gel 하단에 올 때까지 10mA로 전기영동하였다. 전기영동이 끝나면 gel상의 단백질을 nitrocellulose paper(NC)에 10 watts로 6시간 동안 옮긴 다음 5% bovine serum albumin으로 비특이적 단백질결합을 방지하였다. NC를 primary antibody( anti-hsp73, anti-hsp72, anti-grp78; Stressgen, anti- $\alpha$ -sarcomeric actin; Sigma)에 2시간 반응시키고 secondary antibody(peroxidase conjugated anti-mouse IgG antibody, alkaline phosphatase conjugated anti-rabbit IgG antibody; Sigma)에 1시간 반응시켰다. Peroxidase는 0.03% 3, 3'-diaminobenzidine과 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 포함된 0.05M Tris/HCl buffer(pH 7.4)용액에서 발색시켰으며, alkaline phosphatase는 Bio-Rad사의 premixed substrate kit(BCIP and NBT, # 170-6432)로 발

색시켰다.

## 결 과

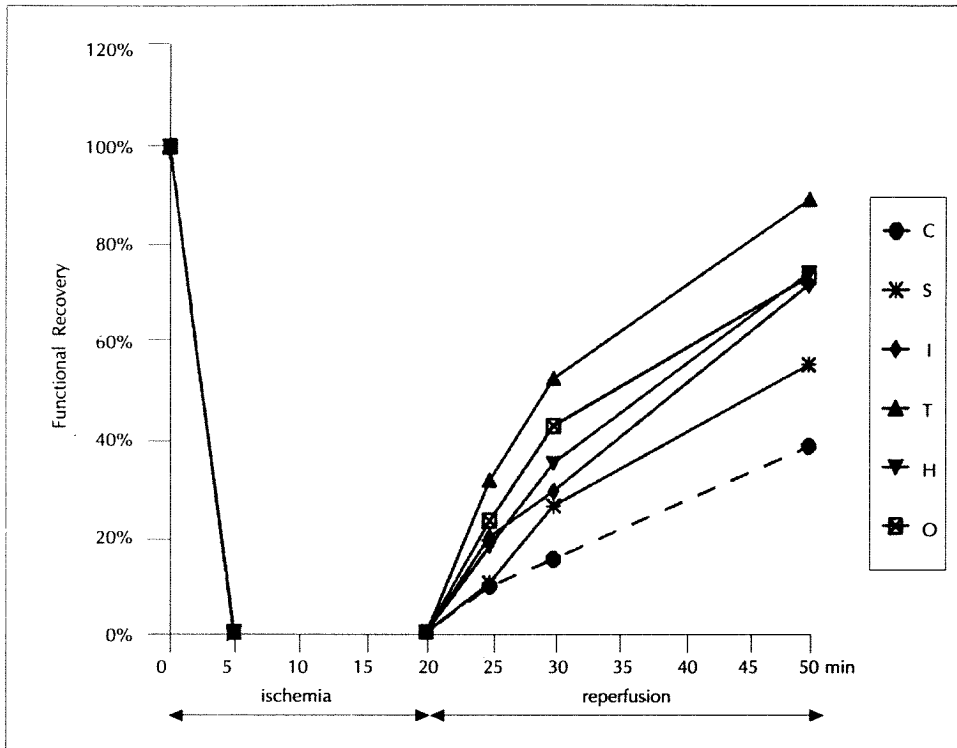
### 1. 허혈/재관류 손상에 대한 스트레스의 보호 효과

#### 1) 심기능 지수

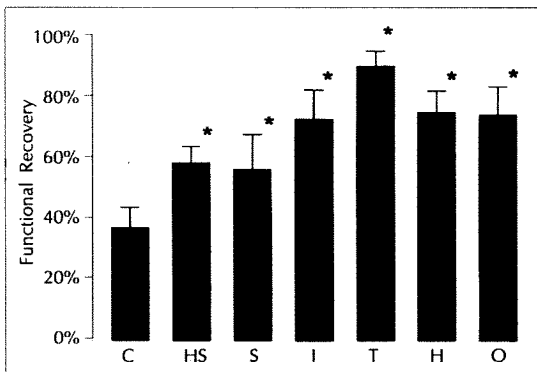
적출 심장을 15분간 관류하여 심수축이 안정화되었을 때의 심기능 지수(심박수×좌심실압×10<sup>-3</sup>)를 기준으로 하여 허혈 및 재관류시 심기능 변화를 백분율로 산출하였다. 모든 실험군에서 허혈기간 동안의 심기능 변화는 그 양상이 유사하였다. 적출심장 관류의 차단시 2분내에 심수축이 정지되며, 약 15분이 경과되면 이완기말 압력이 상승하는 ischemic contracture 소견이 모든 실험군에서 관찰되었다. 20분간의 허혈에 이어 재관류를 시행하면 심장은 곧 매우 불규칙적인 수축과 동시에 점차 contracture가 더 심해져 2분 만에 수축이 매우 약화되었다. 심수축은 재관류 5분부터 서서히 회복하며 이완기말 압력도 점차 낮아졌다. 재관류 30분에는 심기능이 다소 회복되며 이후로는 더 이상 심기능회복에 차이가 없었다. 이와 같은 허혈/재관류에 따른 심기능 회복 정도는 대조군과 스트레스군에서 차이를 보였는데, 모든 스트레스군에서 대조군에 비하여 재관류 초기부터 심기능 회복이 양호하였으며 재관류 30분에는 뚜렷한 심기능 향상이 관찰되었다(Fig. 1). 즉 심기능 회복률은 스트레스 종류에 따라 다소 차이가 있었으나 재관류 30분에서 심기능 회복률은 treadmill 운동군(T군)의 경우 89.3%로 다른 스트레스군보다 우수하였으며 수영군(S군)은 55.3%로 비교적 낮았다(Fig. 2). 통상의 고온자극을 가한 비교 대조군과 실험군의 심기능 회복률을 비교하면, S군을 제외한 모든 스트레스군의 재관류 30분후 심기능 회복이 고온자극군보다 다소 우수하였다(Fig. 2).

#### 2) 이완기말 압력

좌심실 이완기말 압력의 증가는 심실근의 contracture 상태를 나타내는 것으로 이는 허혈/재관류 손상의 정도를 가름하는 지표의 하나이다. 허혈기간 및 재관류 초기에 상승되었던 이완기말 압력은 재관류시간이 경과함에 따라 점차 낮아져 30분에는 모든 실험군에서 초기 상승 압력의 절반 수준 이하로 낮아졌다. 이완기말 압력의 저하는 스트레스군에서 대조군에 비하여 빨리 진



**Fig. 1.** The course of functional recovery at reperfusion after 20min ischemia in isolated hearts of stressed rats(C : control, n = 18 ; S : swimming, n = 11 ; I : immobilization, n=11; t : treadmill exercise, n=10; H : mild heat stress, n=12; O : hyperbaric oxygenation, n=12). Each point represents the mean value.



**Fig. 2.** Functional recovery at 30 min reperfusion after 20 min ischemia. HS : conventional heat shock, n = 8 ; the other symbols and number of experiment are same to those in Fig. 1. Each bar represents the mean and SE. \*p < 0.05 vs control in Student's t-test.

행되어 재관류 30분에는 모든 스트레스군에서 유의한 감소를 보였다(Fig. 3). 고온자극을 가한 비교대조군의 경우에도 30분 재관류시 이완기말 압력은 다른 스트레

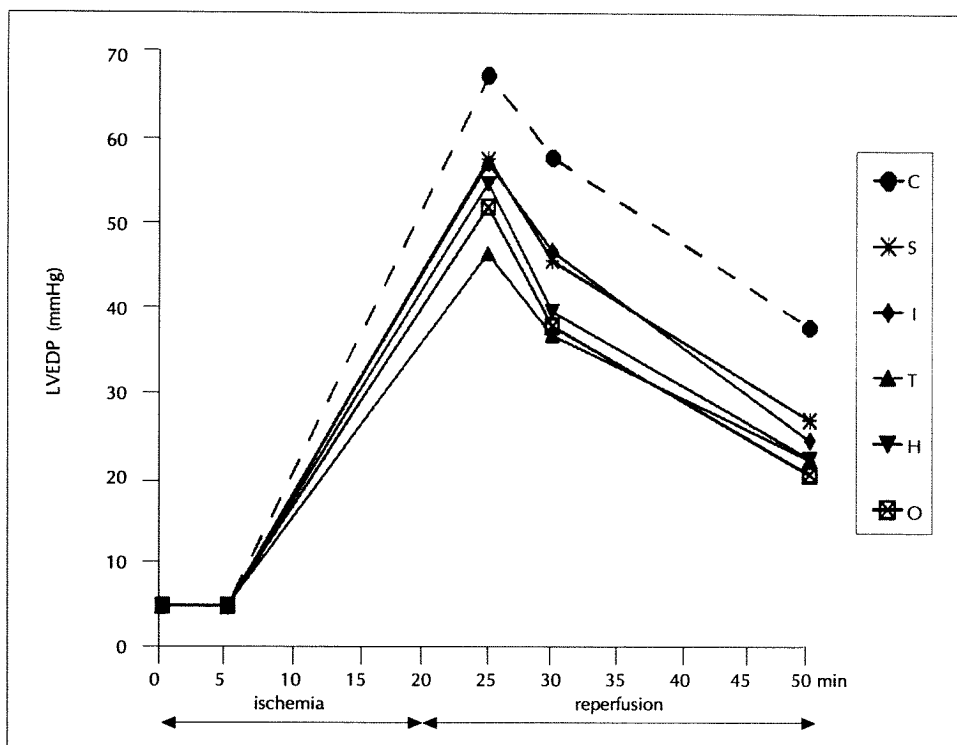
스군과 비슷할 정도로 감소하였다(Fig. 4).

### 3) LDH 유출

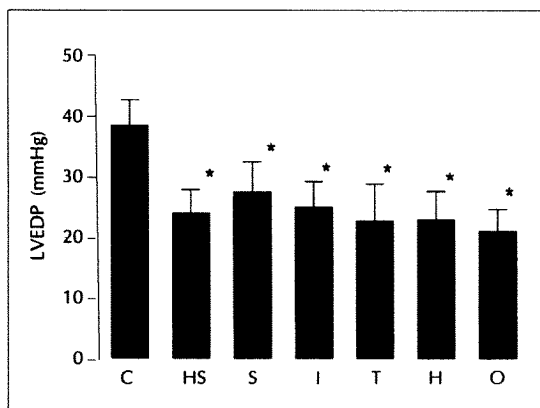
세포막 투과성 증가에 따른 LDH 유출을 세포손상의 지표로 측정하였다. 재관류 초기 5분에 관류액으로 유출되어 나온 LDH의 활성이 대조군(0.60unit/mg, wet weight)에 비하여 모든 스트레스군에서 20% 내지 30% 정도의 의미 있는 감소를 보였다. 각 스트레스군에서의 LDH 유출 방지 효과는 고온자극의 효과와 그 정도가 유사하였다(Fig. 5).

### 2. 스트레스에 의한 SP 발현 유도

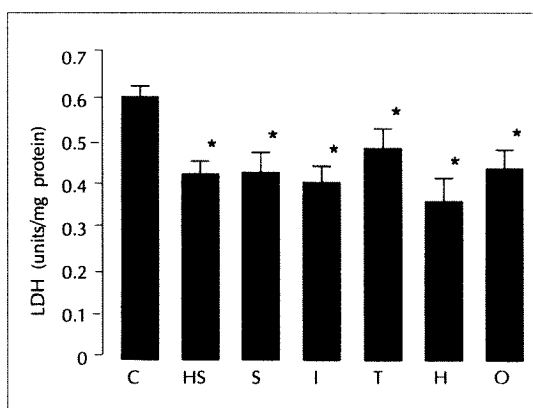
심근의 구조 단백질인  $\alpha$ -sarcomeric actin이 모든 조건에서 일정하게 발색되어 immunoblotting의 전 과정에 문제가 없음을 확인하였다. 고온자극에서 유도가 잘 되는 SP로 알려진 SP72(inducible form)는 대조군에서 매우 미약하게 발현되는데 반하여 Mild Heat Stress군(H군)에서는 현저하게 발현이 증가되었다. 그러나 그 외의 다른 스트레스군에서는 그 발현이 매우 적



**Fig. 3.** Time course of changes in left ventricular end diastolic pressure(LVEDP) in post-ischemic reperused hearts of stressed rats. The symbols and the number of experiment are same to those in Fig. 1. Each point represents the mean value.



**Fig. 4.** LVEDP in post-ischemic reperused hearts of stressed rats. Left ventricular end diastolic pressure (LVEDP) was measured at 30min after reperfusion. The symbols and the number of experiment are same to those in Fig. 2. Each bar represents the mean and SE. \* $p < 0.05$  vs control in Student's t-test.



**Fig. 5.** LDH release after 20min ischemia in post-ischemic reperused hearts of stressed rats. The amount of lactate dehydrogenase(LDH) released into the perfusate during the first 5 minute period of the reperfusion phase was measured by the enzymatic method. Each bar represents the mean and SE. \* $p < 0.05$  vs control in Student's t-test.

어 대조군과 차이가 없었다. 세포내에 항상 존재하며 고온자극시 또한 발현이 증가되는 SP73(constitutive form)은 대조군에서도 어느 정도 발현이 되었으나 스트

레스군에서 발현이 더 증가하지는 않았다. 또한 grp78 역시 대조군에 비하여 스트레스군에서 발현이 증가하지는 않았다(Fig. 6).

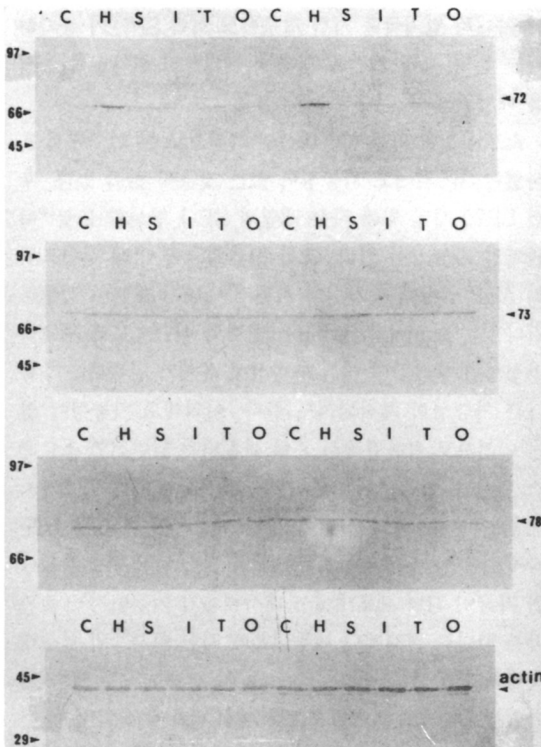


Fig. 6. Immunoblot analysis of SP70 series in stressed rat hearts.

The left numbers : standard markers for molecular weight.

The right numbers : SP72, SP73, GRP78 and actin.

Tye symbols are same to those in Fig. 1.

## 고 안

포유류의 스트레스 반응은 alarm, resistance, exhaustion 3단계로 나눌 수 있으며 내성을 나타내는 단계는 resistance 단계이다<sup>12)</sup>. 그러나 스트레스를 어느 정도 가해야 스트레스 반응이 resistance 단계까지 가며 exhaustion 단계까지 진행되지 않을지 알 수는 없다. 왜냐하면 스트레스의 종류나 방법 그리고 스트레스를 받는 세포의 종류에 따라 스트레스 반응의 진행 정도가 다르며 스트레스 반응의 개체차이가 있을 수 있으므로 내성 획득에 유효한 스트레스 양을 객관화할 수 없기 때문이다. 이런 점에서 강한 자극을 일정하게 가하는 종전의 고온자극법은 너무 위험하여 현실성이 없다. 즉 흰쥐에서 직장 온도가 42℃에서 1℃라도 상승하면 쉽사리 치명적인 단계에 이르며 정확히 온도를 유지한다 해도 스트레스 반응의 개인차로 약 10% 가량 사망하게 된다(결과

미제시). 토끼는 흰쥐 보다 고온자극에 더욱 민감하여 고온자극후 40시간 동안 20%나 호흡기 후유증으로 사망하였다는 보고도 있다<sup>10)</sup>. 따라서 경미한 스트레스를 반복 자극시켜 적응할 시간적 여유를 주어 스트레스 반응이 resistance 단계에 이르게 하는 편이 더 안전할 것이다. 이러한 취지로 본 연구에서는 안전한 스트레스라 여겨지는 mild heat stress, swimming, immobilization, treadmill exercise, hyperbaric oxygen stress 등의 방법을 택하여 허혈내성을 유도하고자 하였다. 본 연구에서 시행한 스트레스 방법에 의해 흰쥐가 사망한 경우는 없었으며 간혹 자극후 3일째까지 설사를 하거나 행동이 위축된 경우가 있기는 하였으나 이 후 정상으로 회복되었다. 이렇듯 안전한 스트레스에 의해서도 심장에서 허혈내성이 유도되었으며 허혈후 심기능 회복률은 오히려 고온자극 방법보다 더 우수하였다.

본 연구에서 각종 스트레스에 의한 허혈/재관류 손상 보호작용을 검토한 결과 심기능 향상은 S군(43%)을 제외하고는 모두 70% 이상이었으며, LDH 유출은 20% 이상 감소하였다. 이러한 허혈보호 효과를 통상의 고온자극의 효과와 비교하면 대체적으로 본 연구에서 시행한 스트레스가 심기능 보호에는 더 우수한 효과를 나타냈으며 세포손상 방지는 거의 비슷한 수준이었다. 그러나 본 연구에서 시행한 고온자극의 허혈 보호 효과가 다른 연구 결과보다 저조하게 나왔기 때문에 본 연구에서 시행한 스트레스 방법이 고온자극 방법보다 객관적으로 우수하다고 평가할 수만은 없을 것으로 보인다. 즉 본 연구와 같은 방법으로 흰쥐를 고온자극하고 24시간 후 적출 심장에서 허혈/재관류 손상을 유도한 Currie등<sup>3)</sup>과 Karmazyn등<sup>6)</sup>의 실험 결과에 따르면 고온자극에 의해 허혈후 심기능 회복률이 약 두 배 증가되고 세포질 효소 유출도 약 70% 감소하였다. 이러한 결과를 본 연구의 고온자극의 효과(심기능 회복률 50% 증가, LDH 30% 감소)와 비교하면 상당한 차이가 난다. 이러한 결과 차이의 원인을 정확히 알 수는 없지만 아마도 동물실이나 실험조건 등 여러 제반 환경이 달라 흰쥐가 받는 스트레스에 차이가 있기 때문이라 생각된다.

고온자극을 이용하여 심장의 허혈손상을 방지하고자 하는데는 고온자극의 위험성 외에도 다른 문제가 최근 제시되고 있다. 즉 고온자극의 허혈 보호 효과가 in vivo에서는 in vitro 만큼 뚜렷하지가 않다는 것이다. 고온자극 24시간후 in vivo로 관상동맥의 혈류를 차단

하여 국소적 허혈을 유도하고 재관류 시키는 경우 심기능 회복률<sup>13)</sup>이나 심근경색 범위<sup>10)</sup>가 대조군과 차이가 없다는 보고들이 최근에 발표되고 있다. 이외에도 in vivo 허혈에 대한 고온자극의 보호효과의 문제점으로 그 효과가 잠정적으로만 나타난다는 것이다. Karmazyn 등<sup>6)</sup>은 in vitro 허혈에서 고온자극의 보호효과가 96시간까지 지속됨을 보고한 반면 in vivo 허혈에서는 자극후 40시간만 되도 그 효과가 상실된다는 것이 Currie 등<sup>10)</sup>에 의해 보고되었다. 따라서 본 연구에서 이용한 여러 스트레스들도 비록 in vitro 허혈에 대해 현저한 보호효과를 나타내기는 하였으나 in vivo 허혈에도 효과가 있을지의 여부와 허혈내성의 지속시간 등이 추후에 반드시 검토되어야 하겠다.

스트레스 발생시 매우 빠른 시간 내에 다량으로 발현되는 SP는 포유류의 스트레스 적응과정에 매우 중요한 역할을 하리라 여겨지고 있다. 비록 SP의 생리적 역할이나 세포 보호작용의 분자적 기전에 관하여 아직 거의 밝혀진 바가 없으나, 지금까지의 연구 결과들에 의하면 유해 조건에서 변성된 단백질들의 비정상적 결합을 방지하거나, 변성 단백질의 3차원적 구조를 재구성하여 재활성화 시키는 "보호분자(molecular chaperone)"로서 역할을 할 것이라는 가설이 가장 유력하다<sup>2)</sup>. 이와 같이 SP가 개체의 생존에 유해한 자극으로부터 세포를 보호한다면 심장의 허혈손상에도 보호작용이 있을 가능성이 있기 때문에 고온자극에 의해 다량 증가되는 SP인 SP72도 허혈내성을 유도할지도 모른다는 가설이 많은 지지를 받고 있다. 그러나 이러한 가설은 SP72가 증가되는 조건에서 허혈내성도 획득된다는 현상론적인 간접증거에 의존한 주장일 뿐 SP72가 허혈내성을 유도하는데 있어서 그 원인-결과 관계가 증명되었지는 못하고 있다. 또한 고온자극으로 SP72의 발현이 증가되었음에도 불구하고 심장의 허혈/재관류 손상이 방지되지 않았더라<sup>9)</sup>, SP72는 수일간 계속 심장조직에 남아 있는데도 허혈내성은 그보다 훨씬 짧은 기간 내에 상실된다는<sup>10)</sup> 반대 주장도 있어 허혈내성에서 SP72의 역할을 단정짓기는 매우 어렵다. 본 연구의 결과에서는 열자극을 가한 HS군과 H군에서 SP72의 발현이 상당히 증가한 반면 다른 스트레스군에서는 전혀 발현이 증가되지 않았으며 SP73과 GRP78은 모든 스트레스 조건에서 발현이 증가되지 않았다. 이러한 결과는 SP70 계열의 증가 없이도 허혈내성이 충분히 획득될 수 있음을 시사하고 있다. 뿐

만 아니라 열자극을 가한 경우에도 비록 SP72가 증가하기는 하나 다른 기전에 의해 허혈내성이 획득될 가능성을 배제할 수는 없다고 생각된다.

스트레스에 의한 허혈내성의 기전으로 본 연구에서 조사했던 SP 외에도 가능성이 있는 것들이 많이 있다. 우선 SP70 계열 외에 다른 계열의 SP나 항산화 물질<sup>14)</sup>이 관여할 가능성이 있다. 또한 고온자극에 의해 심근조직의 ATP 함량이 증가되어 허혈시 에너지 보존이 잘된다거나<sup>10,15)</sup>, immobilization한 흰쥐의 심근세포의 세포막 안정성이 강화되어 허혈시 항상성 유지가 잘된다는<sup>16)</sup> 등 다른 가능성이 제시되기도 한다. 이외에도 가능성이 있는 기전으로 포유류에서 흔히 관찰되는 일반적인 스트레스 반응을 고려해 볼 수 있다. 포유류에서의 스트레스 반응은 단일세포와는 달리 훨씬 복잡하며 이 반응을 두 가지로 나눌 수 있다. 하나는 스트레스가 세포에 직접적인 자극이 되어 세포내에서 대사변화가 이루어지는 것과 다른 하나는 신경계나 내분비계에 의한 이차적인 세포대사변화가 있다. 앞서 언급한 SP의 변화는 자극에 의해 단일세포에서도 일어나므로 전자의 반응에 속하며, 일반적인 모든 스트레스에서 공통적으로 나타나는 비특이적 반응인 adrenocortical hypertrophy, thymicolymphatic atrophy, gastric ulceration 등은 후자 반응의 좋은 예가 된다<sup>12)</sup>. 그러나 지금까지는 허혈내성의 기전 연구가 세포나 분자수준에 집착하여 이루어졌기 때문에 이차적인 스트레스 반응이 경시되었던 경향이 있었다. 본 연구에서 시행한 스트레스는 세포자체에 직접적으로 영향을 주기에는 매우 미약한 정도이므로 오히려 이차적인 스트레스 반응이 세포대사변화에 더 중요한 역할을 할 가능성도 있다고 여겨진다. 실제로 이차적 스트레스 반응은 생체의 많은 대사변화를 초래하며 심하면 비특이적 반응과 같은 기질적인 변화도 일으킬 수 있을 정도로 영향력을 가지고 있다. 따라서 이러한 반응이 심근세포에 영향을 미치고 그 결과로 허혈내성이 획득될 가능성도 있다고 생각된다. 이러한 가능성은 차후에 반드시 검토되어야 할 과제라 사료된다.

## 요 약

### 연구배경 :

심장의 허혈/재관류손상에 대한 새로운 대책으로 스트레스에 대한 자기방어능력을 향진시킴으로써 허혈



내성을 획득케하려는 시도가 있다. 지금까지는 허혈내성 획득을 위한 스트레스로 고온자극이라는 매우 위험한 방법을 취하였기 때문에 현실적으로 안전하게 이를 실현하기 힘들다. 본 연구에서는 현실적으로 실행가능하고 안전하게 심장의 허혈내성을 유도할 수 있는 다양한 스트레스를 찾고, 각 스트레스 조건에서 스트레스 단백질의 발현양상을 조사하여 허혈내성 획득기전의 일면을 밝히 고자 하였다.

#### 방 법 :

환쥐에 경미한 고온자극, 수영, 결박, treadmill, 고압 산소 등의 스트레스를 5일간 하루에 한번씩 가하고 마지막 스트레스 24시간 후에 심장을 적출 하여 Langendorff 장치를 이용해 심장의 허혈/재관류 손상을 유도하였다. 심장의 허혈손상을 관찰하기 위하여 허혈기간(20분)과 재관류기간(30분) 동안 좌심실 압력을 측정하였으며 재관류 초기 5분까지의 LDH 유출을 측정하였다. 허혈내성 기전 연구의 일환으로 스트레스 단백질의 발현을 immunoblot 방법으로 측정하였다.

#### 결 과 :

##### 1) 허혈/재관류 손상에 대한 각종 스트레스의 보호 효과

①심기능 지수 : 모든 스트레스군에서 대조군에 비하여 재관류 초기부터 심기능 회복이 양호하였으며 재관류 30분에는 뚜렷한 심기능 향상이 관찰되었다. 심기능 회복률은 재관류 30분에서 treadmill군이 89.3%로 다른 스트레스군보다 우수하였으며 수영군은 55.3%이었다. 통상의 고온자극(직장온도 42℃, 15분)을 가한 비교 대조군은 회복률이 57.7%로 수영군을 제외한 모든 스트레스군보다 낮았다.

②좌심실 이완기말 압력 : 재관류시 좌심실 이완기말 압력은 모든 스트레스군에서 대조군에 비하여 유의한 감소를 보였다.

③LDH 유출 : 대조군에서 LDH 유출이 0.60unit/mg, wet weight 인데 비하여 스트레스군에서 20% 내지 30% 정도의 의미 있는 감소를 보였다. 각 스트레스군에서의 LDH 유출 방지 효과는 고온자극 비교대조군과 유사하였다.

##### 2) 스트레스 단백질 발현

경미한 열자극군에서 SP72(inducible form)의 발현이 현저하게 증가되었으나 다른 스트레스군에서는 대조군과 차이가 없었다. SP73(constitutive form)과 GRP

78의 발현양은 모든 실험군에서 대조군과 차이가 없었다.

#### 결 론 :

이상의 연구 결과로부터 경미한 스트레스의 반복자극으로 안전하게 심장의 허혈내성을 유도할 수 있었다. 그리고 70계열 스트레스 단백질이 열자극군에서는 허혈내성 획득에 관여할지는 모르나, 허혈내성의 공통기전으로서의 역할을 하지는 못할 것으로 사료되었다.

#### References

- 1) Jolly SR, Kane WJ, Bailie GD : *Canine myocardial reperfusion injury : its reduction by the combined administration. Circ Res* 54 : 277-285, 1984
- 2) Yellon DM, Latchman DS : *Review Article. Stress proteins and myocardial protection. J Mol Cell Cardiol* 24 : 113-124, 1992
- 3) Currie RW, Karmazyn M, Kloc M, Mailer K : *Heat-shock response is associated with enhanced post-ischemic recovery. Cir Res* 63 : 543-549, 1988
- 4) Hiro H, Higo K, Satow Y, Lee Jy : *Induction of hsp70-like protein during organ culture of rat embryonic heart. Biochem Int* 15 : 727-733, 1987
- 5) Currie RW, Karmazyn M : *Improved post-ischemic ventricular recovery in the absence of changes in energy metabolism in working rat hearts following heat-shock. J Mol Cell Cardiol* 22 : 631-636, 1990
- 6) Karmazyn M, Mailer K, Currie RW : *Acquisition and decay of heat-shock enhanced postischemic ventricular recovery. Am J Physiol* 259 : H424-H431, 1990
- 7) Welch WJ : *Mammalian stress response : cell physiology, structure / function of stress proteins, and implications for medicine and disease. Physiol Rev* 72 : 1063-1081, 1992
- 8) Donati YA, Slosman DO, Polla BS : *Oxidative injury and the heat shock response. Biochem Pharmacol* 40 : 2571-2577, 1990
- 9) Yellon DM, Iliodromitis E, Latchman DS, Van Winkle DM, Downey JM, Williams FM, Williams TJ : *Whole body heat stress fails to limit infarct size in the reperfused rabbit heart. Cardiovasc Res* 26 : 342-346, 1992
- 10) Currie RW, Tanguay RM, Kingma JG, Jr : *Heat-shock response and limitation of tissue necrosis during occlusion/reperfusion in rabbit hearts. Circulation*

87 : 963-971, 1993

- 11) Bergmeyer HU, Bernt E : *UV assay of lactate dehydrogenase activity with pyruvate and NADH*, In *Method of Enzymatic Analysis*, Vol II. Bergmeyer HU, 2nd Ed. pp574-579, New York, Academic Press, 1974
- 12) McCarty R : *Stress research : principles, problems and prospects*, In *Stress : Neurochemical and Humoral Mechanisms*, Vol 1. Van Loon GR, Kvetnansky R, McCarty R, Axelrod J Eds. pp3-13, New York, Gordon and Breach Science Publishers, 1989
- 13) Donnelly TJ, Sievers RE, Visjern FLJ, Welch WJ, Wolfe CL : *Heat shock protein induction in rat hearts : A role for improved myocardial salvage after ischemia and reperfusion?* *Circulation* 85 : 769-778,

1992

- 14) Liu X, Engelman RM, Moraru I, Rousou JA, Flack JE, Deaton DW, Maulik N, Das DK : *Heat shock : A new approach for myocardial preservation in cardiac surgery*. *Circulation* 86 : II358-II363, 1992
- 15) Levi E, Vivi A, Vivi M, Navon G, Hasin Y, Horowitz M : *Heat acclimation improves cardiac mechanical and metabolic performance during ischemia and reperfusion*. *Circulation* 84 : II-621, 1991
- 16) Meerson FZ, Malyshev IYu, Shneider AB : *Phenomenon of the adaptive stabilization of sarcoplasmic and nuclear structures in myocardium*. *Basic Res Cardiol* 86 : 205-214, 1991